

Phospholipase 類による生体膜の分解に関する研究

(第3報) ラット肝マイクロソームの Mannose-6-リン酸水解活性の

Phospholipase C 及び A_2 による阻害*

須藤 誠一・畠山 昌和

(山形大学農学部生物化学研究室)

(昭和63年9月1日受理)

Studies on the Degradation of Biomembranes by Phospholipases.

3. Inhibition of Microsomal Mannose-6-Phosphate Phosphohydrolase Activity by Phospholipase C and A_2

Seiichi SUTO and Masakazu HATAKEYAMA

Laboratory of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture,
Yamagata University, Tsuruoka 997, Japan

(Received September 1, 1988)

Summary

1. The reason was investigated of the inhibition of mannose-6-phosphate phosphohydrolase (M 6 Pase) activity by phospholipase C and A_2 . Total M 6 Pase activity was assayed by inorganic phosphate liberation from M 6 P at pH 6.5 in the presence of taurocholate.

2. Both PLase C and A_2 inhibited M 6 Pase activity to the same extent in taurocholate-disrupted microsomes as in undisrupted microsomes.

3. During PLase treatment of microsomes, fatty acids accumulated and M 6 Pase activity decreased. The decrease of M 6 Pase, however, was recovered by the addition of fatty acid-free bovine serum albumin to about 70% of the activity of untreated microsomes. Moreover, M 6 Pase activity was inhibited by fatty acid addition to the incubation medium.

4. From above results it was concluded that phospholipases inhibit microsomal mannose-6-phosphate phosphohydrolase activity mainly through the liberation of fatty acids from microsomal phospholipids during phospholipase treatment.

緒 言

ラット肝 Ms に PLase C を作用させると PL の約 3 分の 2 が分解され, Ms 膜内層に分布する M 6 Pase, G 6 Pase, glucuronidase 活性が阻害されることをこのシ

リーズ第 1 報で報告した¹⁾.

PLase は水溶性の高分子だから Ms 膜の内層にまでは侵入しないと考えられて, PL や酵素活性などの Ms 膜内外層への分布を測定するのに使用されてきた²⁾. また, M 6 Pase は等張条件で界面活性剤不添加の場合の活性の小さいほど Ms 膜の破壊が少ないと考えられている³⁾. 界面活性剤で膜を破壊した場合に発現する total M 6 Pase 活性が PLase C で阻害されることを示した第 1 報の結果は, PLase C の作用が内層にまで及ぶことを示唆する. もし, それが PLase C の内層への侵入によるものであるならば, PLase C は probe として使用できないことになるので, 阻害様式の解明は重要な問題である.

略号; BSA: bovine serum albumin, EtOH: ethanol, FA: fatty acid, Ms: microsomes, PLase: phospholipase, PL: phospholipid, PC & PE & PI & PS: phosphatidyl-choline & -ethanolamine & -inositol & -serine, Sph: sphingomyelin, TC: Na taurocholate

* 本研究の一部は日本農芸化学会 昭和59年度大会 (1984)で発表した(要旨集, p. 371)

本報では, M 6 Pase の阻害は PLase 及び Ms 内在性 hepatic lipase によって PL から生成し蓄積された脂肪酸²⁾による, という結果を報告する。

実験材料及び方法

1. Ms の調製

ドンリュウラット (日本ラット K. K. より購入) の肝臓から, 前報のように調製した^{1,2)}。

2. Ms の PLase 処理

0.25 M sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 各 5 mM の CaCl_2 及び $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ の組成の反応液 1.8 ml に蛋白質 10 mg を含む Ms (10 mg Ms) を suspend し, 50% glycerol に溶解した PLase C 又は A_2 を 6 単位加え, 19° に 30 分 incubate した。33 mM Na_2EDTA 0.2 ml 添加して PLase 作用を停止して, PLase-treated Ms として用いた。Treated Ms を回収する場合は, 多量の氷冷 0.25 M sucrose で希釈し, 54,000×g, 60 分遠心し沈殿させた。

3. Disrupted Ms の調製

Ms 又は PLase-treated Ms を 0.25 M sucrose-10 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中に suspend して TC を 0.4% になるように添加し, 氷水中に 30 分以上 incubate して実験に供した。

4. M 6 Pase 活性の測定

4-1. Undisrupted Activity ; TC による Ms 膜の溶解操作を加えないで測定した活性である。反応液 1 ml 中に 50 μmol cacodylate buffer (pH 6.5), 250 μmol sucrose, Ms 又は treated Ms 約 1 mg, M 6 P 10 μmol を含む組成で, 30° に 10 分 incubate し, 10% TCA 1 ml 加えて反応を停止し, 生成した Pi を測定した。

4-2. Total Activity ; TC-disrupted Ms が示す活性である。3 で調製した disrupted Ms を, 終濃度 0.4% TC に調整した 4-1 と同一組成の反応液と incubate した。

G 6 Pase 活性は, M 6 P の代りに G 6 P を同量用いて測定した。

5. 分析

蛋白質は Lowry らの方法⁵⁾の Markwell らによる変法⁶⁾によって定量した。リン酸及び脂質成分の定量は前

報^{1,2)}にしたがった。

6. 試 薬

PLase C (*Clostridium perfringens*) 及び A_2 (*Naja naja*), M 6 P, G 6 P, Na taurocholate, FA-free bovine serum albumin は Sigma 社より, 脂肪酸は東京化成工業より購入し, そのまま使用した。

実験結果

最初に M 6 Pase 活性の測定条件を検討して, disrupted Ms による Pi 生成量 (total activity) は TC 濃度 0.2~0.4% で最大であり, 20 分まで時間に比例し, 10 分間の Pi 生成量は Ms 3 mg/ml まで比例関係にあることを確認した。この結果から反応液 1 ml あたり Ms 1 mg, 0.4% TC, 反応時間 10 分の反応条件を設定した。

1. PLase C による M 6 Pase 活性の阻害

EDTA で反応停止した PLase C-treated Ms を用いて M 6 Pase 活性阻害を吟味した結果を Fig. 1 に示す。第

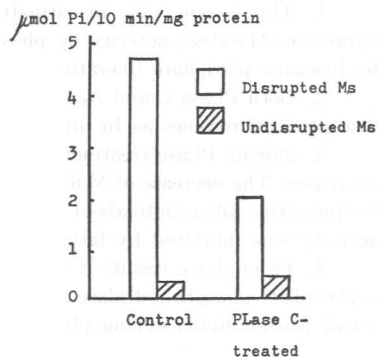


Fig. 1. Effect of PLase C on Microsomal M 6 Pase Activities.

1 報¹⁾の結果と同じく, undisrupted activity は PLase C 処理で阻害されないが, PLase C-treated Ms を disrupt して発現する total activity は 2 分の 1 以下まで低下した。なお, PLase-treated Ms を遠心して回収した場合の total activity も同じ結果を示した。又, M 6 P の代りに G 6 P の水解活性測定でも同様であった。

この結果は見かけ上 PLase C が内層まで影響することを示すが, undisrupted Ms の M 6 Pase 活性は全活性の 8% 程度にすぎずに阻害もされないから, PLase C が内層にまで侵入して阻害したとは考えがたい。この点を検討するために, あらかじめ TC で膜を溶解して

PLase が内層に直接作用できると考えられる条件下での M 6 Pase 活性の阻害について実験した。

2. M 6 Pase 活性阻害に及ぼす TC 前処理の影響

TC で Ms を前処理したのち、0.4% TC 共存下に PLase C 又は A₂ を作用させた場合の M 6 Pase 活性の阻害を Fig. 2 に示す。白抜き柱で PLase 処理しない

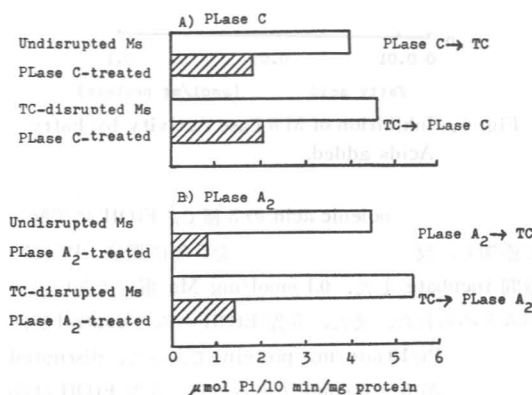


Fig. 2. Effect of Pre-disruption of Microsomes with Taurocholate before PLase Treatment on Total M 6 Pase Activity.

Ms 活性を、斜線柱で PLase 処理した Ms の活性を示す。PLase 処理と TC 処理の順序は図中に矢印で示す。TC で膜を disrupt してから PLase を作用させた場合も、PLase 処理を先にしてから TC で disrupt した場合と同じ程度の阻害を示した。また、PLase A₂ の方が C より阻害が大きい。G 6 Pase 活性でも同様の結果であった。

以上のように、PLase 作用の前に TC で disrupt しても、しない場合と阻害に差がないことは、PLase は酵素蛋白質に直接作用するよりも、膜脂質を変化させることによって阻害をおこすことを示すと考えられるので、PL の分解を検索した。Fig. 3 に TC 処理 Ms に PLase C を作用させたものの PL 定量の結果を示す。白抜き柱で untreated Ms の全 PL リンに対する各 PL 種リンの%を、斜線柱で PLase C 作用後残存した各 PL 種リンの%をあらわす。PL 全体の分解は 100% にならず、PE と PC が強く分解され、残存 PL 中での PI+PS 画分の割合が相対的に大きくなり、TC-undisrupted Ms に PLase C を作用させたときの分解¹⁾と同じ傾向であった。また、PLase の作用によって M 6 Pase 活性阻害物質の生成することが考えられる。使用した実験条件で

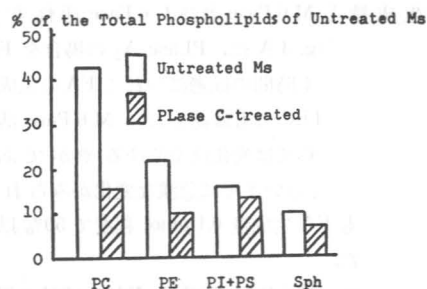


Fig. 3. Degradation of Microsomal Phospholipid Species by PLase C in the Presence of Taurocholate.

は、PLase A₂ による FA の生成だけでなく、PLase C でも二次的に FA を生成する²⁾ので、次に FA 生成と M 6 Pase 活性の阻害の相関を検索した。

3. FA 生成と M 6 Pase 阻害

Disrupted Ms に 19° で PLase C を作用させた場合の

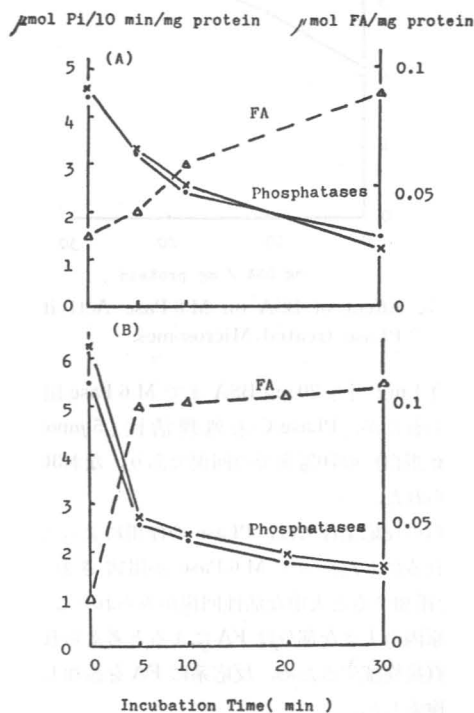


Fig. 4. Relation of Phosphatase Activities and Fatty Acid Accumulation. (A) PLase C Treatment (B) PLase A₂ Treatment •, M 6 Pase ; ×, G 6 Pase ; △, FA

FA の生成量と M 6 Pase 及び G 6 Pase 活性変化の time course を Fig. 4 A に, PLase A₂ の場合を Fig. 4 B に示す。いずれも時間の経過につれて FA の生成量が増し(FA 生成は TLC でも確認した), M 6 Pase 活性は低下する。PLase C では変化はややゆるやかであったが, A₂ では5分くらいまでに急激な変化がみられた。いずれの場合も FA 生成量 0.1 μ mol 程度で50%以上の阻害がみられた。

以上のように, M 6 Pase 阻害と FA 生成量に相関がみられたので, FA-free BSA 添加による FA 除去の効果の有無について実験した。

4. BSA 添加による阻害の回復

PLase 処理 Ms に FA-free BSA を添加し, 0° で30分 incubate したのち M 6 Pase 活性を測定した。(Fig. 5)。

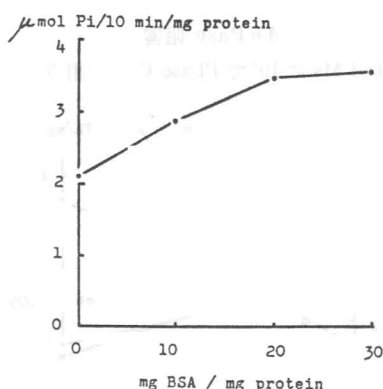


Fig. 5. Effect of BSA on M 6 Pase Activity of PLase-treated Microsomes.

Ms 蛋白 1 mg 当り 20 mg BSA まで M 6 Pase 阻害の回復がみられたが, PLase C 未処理活性 (5 μ mol Pi/10 min/mg 蛋白) の70%までの回復であり, なお30%の阻害がみられた。

これらの反応条件では, PLase の作用によって FA が蓄積されるにしたがって M 6 Pase が阻害されるが, BSA を添加すると大巾な活性回復がみられたことは, 阻害の原因の大きな部分は FA によると考えられる。この点を直接検証するため, 反応系に FA を添加して阻害の有無を検索した。

5. FA 添加による M 6 Pase 活性の阻害

TC-disrupted Ms に FA を添加したときの M 6 Pase 活性の阻害を Fig. 6 に示す。使用した FA は oleic acid,

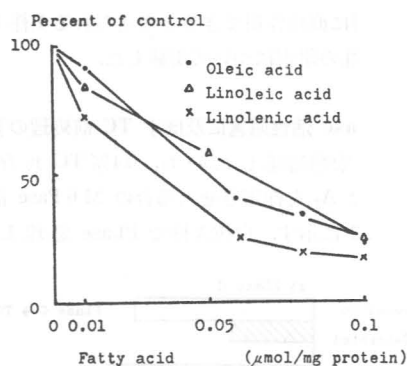


Fig. 6. Inhibition of M 6 Pase Activity by Fatty Acids added.

linoleic acid, linolenic acid の3種で, EtOH に溶解して添加し, 反応液の EtOH 濃度を5%に調整, 19° に30分間 incubate した。0.1 μ mol/mg Ms 蛋白で強い阻害がみとめられた。また, 5% EtOH のみの control 値は 2.43 μ mol Pi/10 min/mg protein であって, disrupted Ms の活性が 5~6 μ mol であるから, 5% EtOH は50%以上 M 6 Pase 活性を阻害した。

考 察

本シリーズ第2報に示したように, Ms は PLase C 処理でも FA を生成する²⁾。FA の蓄積と M 6 Pase 活性の減少がパラレルであり (Fig. 4), 血清アルブミンで活性が回復し (Fig. 5), かつ長鎖 FA の添加で M 6 Pase 活性が強く阻害される (Fig. 6) ことは, PLase は FA を生成して M 6 Pase 活性を阻害することを明示している。FA は脂溶性で Ms 膜の透過バリアを通過するので, 内外層への酵素などの分布を調査するのに PLase を用いる際には, FA などの阻害作用に留意する必要がある。

今回の FA 添加実験では FA をエタノールにとかし, 反応液は5%エタノールに調整したが, M 6 Pase 活性はそのエタノール濃度でも50%阻害された。今後 FA の阻害機構の解明のためには, 有機溶剤を用いに行なえる実験方法とより純化した酵素系の考案が重要である。

摘 要

1. 肝マイクロソームの mannose-6-phosphate 水解活性 (M 6 Pase 活性) の phospholipase C 及び A₂ による阻害様式を研究した。

Total M 6 Pase 活性はタウロコール酸 Na でマイクロソームを溶解したのち, その存在下, pH 6.5 で M 6 P

から遊離する無機リンを測定して求めた。

2. Phospholipase C 及び A_2 とも、マイクロソームをあらかじめタウロコール酸 Na で溶解してから作用させても、未処理マイクロソームに作用させた場合と同程度の阻害効果を示した。

3. Phospholipase 処理中、脂肪酸の生成と M 6 Pase 活性の減少がパラレルに進行し、これに牛血清アルブミンを添加すると M 6 Pase は未処理マイクロソームの70%程度まで回復した。また、外部から添加した脂肪酸によって強く阻害された。

4. 以上によって、phospholipase 処理中に生成する脂肪酸がマイクロソームの mannose-phosphate 水解酵素活性を阻害すると結論した。

引用文献

- 1) 須藤誠一(1985)山形大学紀要(農学) 9(4), 505
- 2) 須藤誠一・磯田幸博・首藤博敏・森 広次・大畑元造・佐藤博信(1986)*ibid*, 10(1), 99
- 3) DePierre, J. W. & Ernster, L. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 48, 47
- 4) Arion, W. J., Ballas, L. M., Lange, A. J., & Wallin, B. K. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4901
- 5) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265
- 6) Marwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L., & Tolbert, N. E. (1978) *Anal. Biochem.* 87, 206